

Rola koneksyny 43 w regulacji funkcji mitochondriów podczas zjawiska hartowania (*preconditioning*)

The role of connexin 43 in preconditioning. Impact on mitochondrial function

Katarzyna Janczarska, Beata Kieć-Wilk, Iwona Leszczyńska-Gotąbek, Małgorzata Malczewska-Malec, Marek Bodzioch

Zakład Biochemii Klinicznej, Katedra Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, Kraków

Kardiologia Polska 2010; 68: 91-96

Wstęp

Komunikacja międzykomórkowa odgrywa istotną rolę w utrzymaniu funkcji tkanek i regulacji procesów różnicowania, proliferacji i śmierci komórek [1]. Komórki komunikują się między sobą endokrynnie poprzez uwalnianie substancji (hormony, cytokiny, czynniki wzrostu) i oddziaływanie tych substancji na ich specyficzne receptory [2]. Ponadto istotnym sposobem komunikacji międzykomórkowej jest tworzenie różnego rodzaju swoistych połączeń (kanałów) z białek transbłonowych sąsiadujących w tkance komórek. Wyróżnia się cztery kategorie takich białek: połączenia adherentne (ang. *adherens junction*, AJ), połączenia barierowe (ang. *tight junction*, TJ), połączenia mechaniczne (ang. *desmosomes junction*, DJ) i połączenia komunikacyjne, tzw. połączenia szczelinowe (ang. *gap junction*, GJ) [3, 4].

Połączenia GJ widoczne w mikroskopie elektronowym mają formę wąskich szczelin (2–4 nm) pomiędzy błonami dwóch sąsiadujących komórek [2, 5]. Połączenia te są niezbędne do szybkiego przekazywania sygnału elektrycznego lub wolniejszego przepływu nieorganicznych jonów (np.: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, H⁺) i małych cząsteczek o masie cząsteczkowej poniżej 1 kDa (np.: cykliczne nukleotydy, ATP, trifosforan inozytolu) między sąsiadującymi komórkami. Usprawnia to utrzymanie homeostazy i koordynuje zbiorczą pracę komórek w odpowiedzi tkankowej [2, 6, 7]. Połączenia te odpowiadają głównie za: utrzymanie właściwej miejscowej kooperacji komórek w prawidłowej odpowiedzi tkankowej – od współpracy metabolicznej, przekazu bodźców, funkcji skurczowo-rozkurczowej, przekazywania sygnałów odpowiedzialnych za aktywację apoptozy lub chroniących komórki przed tym procesem, po różnicowanie, rozwój i mi-

grację komórek – prawidłowy rozwój embrionalny i przebudowę (*remodeling*) tkanek organizmu [8].

Połączenia szczelinowe uważane są za najbardziej uniwersalne łącze międzykomórkowe, występują między komórkami wszystkich tkanek z wyjątkiem całkowicie zróżnicowanych komórek mięśni poprzecznie prążkowanych, krwinek czerwonych, płytek krwi oraz spermatocytów [6, 8].

Połączenia GJ mogą występować pomiędzy komórkami homotypowymi: komórka śródbłonna – komórka śródbłonna, miocyt – miocyt itp., ale także pomiędzy komórkami heterotypowymi, np. komórka śródbłonna – miocyt, umożliwiając przekazywanie hiperpolaryzacji z jednej komórki na drugą. Istnienie tych swoistych zespołów po części tłumaczy zjawisko powstania i rozprzestrzeniania się hiperpolaryzacji z endotelium na sąsiednie komórki śródbłonna, a także na położone niżej komórki mięśni gładkich w odpowiedzi na działanie agonistów. Jest to przypuszczalnie mechanizm działania np. śródbłonkowego czynnika depolarizującego (ang. *endothelial derived hyperpolarising factor*, EDHF) [9, 10].

Jedną z głównych grup białek transbłonowych tworzących połączenia międzykomórkowe jest grupa koneksyn (Cxs) [2]. Dotychczas poznano 20 izoform tego białka, które są kodowane przez różne geny. Poszczególne odmiany tego białka charakteryzują się specyficznością tkankową [7]. W kardiomiocytach stwierdzono ekspresję trzech koneksyn: Cx40, Cx43 i Cx45 [11]. Każda z nich wykazuje swoje przewodnictwo, przepuszczalność i właściwości bramkujące. Cechą Cx40 jest wysokie przewodnictwo kanałów w miocytach przedsionków serca i układzie przewodzącym [11, 12]. Koneksyna Cx43 występuje głównie w mięśniu ko-

Adres do korespondencji:

mgr Katarzyna Janczarska, Katedra Biochemii Klinicznej, Zakład Biochemii Klinicznej, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Kopernika 15a, 31-501 Kraków, tel.: +48 12 424 87 92, faks: +48 12 421 40 73, e-mail: kkosno@wp.pl

Praca wpłynęła: 10.06.2009. Zaakceptowana do druku: 15.06.2009.

Praca powstała w ramach realizacji projektu statutowego CM UJ nr: K/ZDS/000683.

mór i w mniejszym stopniu w przedsionku serca i śródbłonku naczyń, natomiast Cx45 występuje głównie w węzle zatokowym i przedsionkowo-komorowym i wykazuje niskie przewodnictwo kanałów międzykomórkowych miocytów na granicy pomiędzy układem przewodzącym a pracującym miokardium [11].

Obserwacje i badania wykazały, że zmiany w czasoprzestrzennym uporządkowaniu połączenia typu GJ są mechanizmem tkankowym zaburzenia rytmu w chorobach mięśnia sercowego. Przypuszcza się, że nieprawidłowa dystrybucja i funkcja połączeń tego typu może powodować nieprawidłowe przewodzenie i zwiększoną anizotropię elektryczną przedsionków, co zwiększa ryzyko ich migotania [13]. Podczas niedokrwienia następuje wzrost oporności mięśnia sercowego i redukcja zdolności do przewodzenia bodźców, charakteryzująca się spadkiem kurczliwości serca i skłonnością do arytmii [11]. Poziom mRNA Cx43 szybko spada w niedokrwieniu mięśnia serca. Podobne zjawisko zaobserwowano w modelu bakteryjnego zapalenia wsierdza wywołanego działaniem lipopolisacharydu (LPS) u szczurów [2]. Wykazano, że także przestrzenna dystrybucja koneksyn ulega zmianie w strefie zawałowej. I tak, w obszarze blizny pozawałowej zaobserwowano zmniejszenie ilości Cx43. W porównaniu z rejonami o normalnej dystrybucji połączeń GJ w prawidłowym mięśniu serca, w strefie zawału następuje 47-procentowa redukcja ich ilości w przeliczeniu na powierzchnię komórek, co odpowiada ok. 30-procentowej redukcji ilości połączeń w przeliczeniu na pojedynczą komórkę mięśniową. W wyniku opisanych zmian i redystrybucji Cx43 dochodzi więc do zwiększenia podatności na rozwój arytmii komorowej w strefie zawałowej [11].

Stwierdzono, że również w przebiegu innych schorzeń i w stanach fizjologicznych zmienia się ilość i dystrybucja koneksyn. W końcowym stadium choroby niedokrwiennej serca i kardiomiopatii rozstrzeniowej następuje wzrost ekspresji Cx40 z jednoczesną redukcją poziomu Cx43 i Cx45. Na podstawie tej obserwacji Alex i wsp. wysnuli hipotezę o możliwości opracowania nowej grupy leków dla poprawy funkcji mięśnia serca w niedotlenieniu [11].

Podczas ciąży, tak jak w nadciśnieniu, zwiększa się zarówno ekspresja koneksyn, jak i liczba połączeń mio-endotelialnych w tkankach. Niektórzy autorzy postulują, że jest to mechanizm kompensujący zmniejszenie efektywności działania tlenu azotu (NO) [10].

Dotychczasowe badania kliniczne wykazały, że mutacje w obrębie genów kodujących białka koneksyn są odpowiedzialne za rozwój różnych typów wad rozwojowych [14]. Kontrolowana w warunkach laboratoryjnych delecja genu dla koneksyny 43 u myszy powoduje powstanie śmiertelnych anomalii anatomicznych serca [14]. U ludzi z mutacją tego genu występowały wady umiejscowienia narządów w symetrii lewo-prawej (heterotaksja), a mutacje wiodące do zaburzenia struktury połączeń GJ są odpowiedzialne za powstanie zespołu objawów zwanego zespołem Charcot-Marie-Tooth (CMT) [14].

Budowa i funkcje połączeń *gap junction*

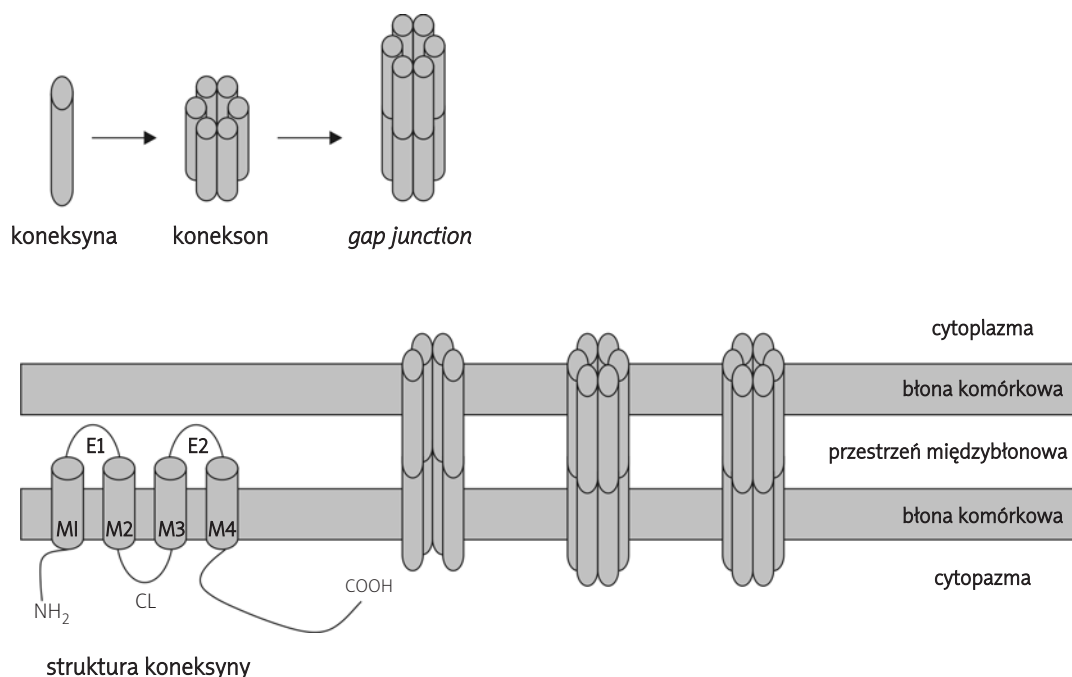
Połączenia typu GJ zbudowane są z jednostek integralnego białka błonowego zwanego koneksyną [2, 6]. Należy ono do polimorficznej grupy białek. Poznano 20 rodzajów koneksyn u myszy i 21 koneksyn u ludzi, które są scharakteryzowane ze względu na lokalizację tkankową i zdolność formowania kanałów [7, 8, 15, 16]. Sześć podjednostek koneksynowych tworzy półkanały zwane koneksonami, natomiast dwie koneksyny sąsiadujących komórek tworzą połączenie GJ [16] (Rycina 1.). Rodzaj koneksonów tworzących połączenia oraz ich skład białkowy pozwala na wyróżnienie czterech typów połączeń GJ: 1) homometryczno-homotypowe (ang. *homomeric-homotypic*), zbudowane z dwóch identycznych koneksonów; 2) homometryczno-heterotypowe (ang. *homomeric-heterotypic*), gdy jeden półkanał zbudowany jest z jednego rodzaju białka, a drugi konekson z drugiego rodzaju białka; 3) heterometryczno-homotypowe (ang. *heteromeric-homotypic*), gdy każdy z koneksonów utworzony jest z dwóch koneksyn; oraz 4) heterometryczno-heterotypowe (ang. *heteromeric-heterotypic*), cechujące się najbardziej zróżnicowanym składem białkowym. Rodzaj koneksyn obecnych w poszczególnych kanałach decyduje nie tylko o typie połączenia, ale przede wszystkim wpływa na ich właściwości biofizyczne [8, 17].

Przepuszczalność połączeń typu *gap* zależy przede wszystkim od rodzaju koneksyn tworzących kanał [18]. Połączenia te nie są strukturami statycznymi, a ich otwieranie i zamykanie przebiega w sposób kontrolowany [6].

Synteza cząsteczki koneksyny

Struktura koneksyn jest bardzo konserwatywna. Koneksyny są kodowane w pojedynczych kopiach genów, które są zlokalizowane na kilku chromosomach [2, 16]. Na chromosomie 1 kodowanych jest osiem koneksyn, na chromosomie 6 cztery, na chromosomie 13 trzy, na chromosomie 17 dwa, natomiast geny chromosomów 7, 10, 15 i X kodują po jednej cząsteczce białka koneksyny [19].

Białka koneksyn są syntetyzowane w szorstkiej siateczce endoplazmatycznej. Po oligomeryzacji koneksonów z wytworzeniem mostków dwusiarczkowych ulegają one egzocytozie przez aparat Golgiego, a następnie agregują w obrębie błony komórkowej, tworząc kanały. W warunkach *in vitro* połączenia szczelinowe powstają w ciągu kilkunastu minut i równie szybko ulegają dezintegracji. Mechanizmy regulujące liczbę połączeń i ich aktywność to zarówno aktywacja ekspresji genów koneksyn, jak i fosorylacja białka koneksyn, m.in. wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia i pH, wolne rodniki (ang. *reactive oxygen species*, ROS) oraz potencjał antyoksydacyjny komórki [6]. Nabłonkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*, EGF), glikokortykoidy, cAMP, glukagon, hormony płciowe czy retinoidy, karotenoidy, wyciąg z zielonej herbaty, estry forbolu TPA (*12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*), estry glicerolu (*1-oleoyl-2-acetylgllycerol*, OAG) regulują komunikację międzykomórkową oraz ekspresję koneksyn w komórkach [6, 20, 21].



Rycina 1. Budowa cząsteczki koneksyny i połączeń typu *gap junction*. Cząsteczka koneksyny zbudowana jest z czterech transbłonowych domen M1–M4, dwóch zewnątrzkomórkowych domen E1, E2 i dwóch wewnątrzkomórkowych domen: C-końca i pętli cytoplazmatycznej (*cytoplasmic loop*, CL) zawierającej N-końiec

Zaburzenie funkcji połączeń typu GJ może występować w wyniku zaburzeń ekspresji genów tych białek (mutacje, metylacja regionów regulatorowych itp.). Może to powodować zmianę ekspresji lub powstanie białka o zmienionej budowie, a tym samym zaburzone funkcjonowaniu [22, 23]. Wydaje się, że metylacja – kowalentne przyłączenie grupy metylowej do cytozyny zlokalizowanej w obrębie tzw. wyspy cytozynowo-guaninowej (*CpG island*) wchodzących w skład regionów promotorowych genów kodujących koneksyny – jest ważnym mechanizmem modulującym ekspresję genów dla tych białek w chorobie nowotworowej [22–24]. Udowodniono brak połączeń typu *gap* między komórkami nowotworowymi a otaczającymi je komórkami zdrowymi (zaburzone połączenia heterologiczne typu *gap*) [6]. Dotychczas mechanizmy będące przyczyną tych zaburzeń nie są znane, najprawdopodobniej wiążą się z nieprawidłową fosforylacją koneksyn i/lub zaburzeniami ekspresji cząstek adhezyjnych CAM (ang. *cell adhesion molecules*) [6].

Wykazano, że warunki stresowe, takie jak zwiększone stężenie homocysteiny (Hcy) – hiperhomocysteinemia, czy ischemia/reperfuzja, indukują nadekspresję Cx43 w śródbłonku, ale nie jest ona połączona ze wzrostem komunikacji i zwiększonym wytwarzaniem połączeń szczelinowych [25]. Równocześnie stwierdzono, że nadekspresja Cx43 jest związana z jej redystrybucją do mitochondriów, jednakże konsekwencje tego procesu nie są do końca poznane. Na podstawie dotychczasowych badań i obserwacji

sugeruje się, że obecna w błonie mitochondrialnej koneksyna chroni komórkę przed apoptozą [25].

Rola koneksyny 43 w zjawisku hartowania komórek mięśnia serca i komórek śródbłonka przez niedotlenienie

Koneksyna 43, jako jedno z głównych białek tworzących połączenia szczelinowe, np. w komórkach endotelialnych, odpowiada za regulację metabolizmu i procesów odpowiedzi zapalnej komórek miokardium i ściany naczyń. Udowodniono, że Cx43 reguluje odpowiedź immunologiczną ustroju, modyfikując syntezę cytokin i ROS [15]. W wielu publikacjach przedstawiono dowody, że Cx43 ma odgrywać ważną rolę w procesie tzw. „hartowania tkanek” przez niedokrwienie (ang. *ischemic preconditioning*, IP) [26–28]. Mechanizm tego typu przygotowania komórek na przyjęcie następczego, niebezpiecznego dla vitalności komórki bodźca, jest wieloczynnikowy i nie do końca poznany. Za jeden z mechanizmów uważa się zmniejszenie przepuszczalności połączeń szczelinowych, zmianę fosforylacji Cx43 pod wpływem kinazy białkowej $C\epsilon$ (ang. *protein kinase C ϵ* , PCK ϵ) [26].

Spadek przewodnictwa elektrycznego podczas ostrego niedokrwienia serca jest skorelowany z defosforylacją, ale i redystrybucją komórkową (zwiększenie stężenia w cytozolu) Cx43 [2]. Równolegle obserwuje się wzrost wewnątrzkomórkowego poziomu jonów Ca^{2+} i H^{+} oraz akumulację metabolitów lipidów i ich wolnych rodników.

Spadek przewodnictwa mięśnia sercowego po niedokrwieniu jest więc połączony ze zmniejszoną biosyntezą, defosforylacją Cx43 wewnątrz połączeń szczelinowych i translokacją tych białek z błony komórki do cytoplazmy [29].

Jednym z ważnych mechanizmów hartowania tkanek, np. przez diazoksyd, jest generacja wolnych rodników tlenowych, regulowana aktywacją zależnych od ATP mitochondrialnych kanałów potasowych (mitoK⁺_{ATP} channels), indukująca zmianę fosforylacji białka Cx43 i zmniejszenie komunikacji międzykomórkowej z udziałem połączeń GJ, co ma zapobiegać szerzeniu się sygnału apoptotycznego [25]. Dalsze badania wykazały jednak, że wprowadzenie translokacji Cx43 do mitochondriów nasila generację ROS i cytoprotekcyjne działanie diazoksydu, ale zahamowanie kanałów mitoK⁺_{ATP} przez specyficzne blokery nie hamuje zjawiska IP (hartowania przez niedotlenienie) [30]. Rodríguez-Sinovas i wsp. wykazali, że w translokacji Cx43 z zewnętrznej do wewnętrznej błony mitochondrium towarzyszy układ nośnikowy białek Tom20 i Hsp90 odpowiedzialny i że ten proces jest hamowany przez geldamycynę [31]. Wykazali również, że geldamycyna hamuje cytoprotekcję indukowaną przez diazoksyd, ale nie przez niedotlenienie (IP) czy izoprenalinę [31]. Muszą zatem istnieć dodatkowe mechanizmy, niezwiązane z transportem Cx43 do wewnętrznej błony mitochondrium, odpowiedzialne za mechanizm cytoprotekcji zależny od IP.

Badania prowadzone na myszach transgenicznych z obniżonym poziomem ekspresji Cx43 potwierdziły protekcyjną rolę tego białka w osłonie kardiomiocytów przed martwicą w mechanizmie IP. Heterozygotyczne myszy z niedoborem Cx43 wykazywały bowiem znacznie rozleglejsze zmiany martwicze kardiomiocytów w przebiegu niedokrwienia mięśnia serca w porównaniu z myszami kontrolnymi o prawidłowej ekspresji [32]. Sugeruje się, że Cx43 jest niezbędna dla mediowania cytoprotekcyjnego działania aktywacji receptorów mitoK⁺_{ATP} i generacji tą drogą cytoprotekcyjnie działających niewielkich ilości ROS (w tym NO) w mitochondriach i tylko całkowite zahamowanie obecności Cx43 w mitochondriach hamuje cytoprotekcję wywołaną „hartowaniem” [31].

Błona mitochondriów zbudowana jest z dwóch błon – zewnętrznej i wewnętrznej. Zawiera ona nieselektywne tzw. mitochondrialne megakanały PTP (ang. *permeability transition pore* lub *mitochondrial permeability transition pore*, MPTP), których otwarcie np. w obecności jonów wapnia, nieorganicznych fosforanów, cyklosporyny A czy depolaryzacji błony mitochondrialnej prowadzi do przenikania do mitochondriów cząsteczek o masie mniejszej niż 1,5 kDa, pęcznienia i rozerwania mitochondriów z uwolnieniem zawartych w nich enzymów, w tym czynnika indukującego apoptozę (ang. *apoptosis inducing factor*, AIF), cytochromu c czy endonukleazy G, zapoczątkowując jedną z dróg apoptozy komórki i jej śmierć [9, 33]. MPTP jest nieselektywnym kanałem, który powstaje przez połączenia białek zewnętrznej i wewnętrznej błony mitochondrial-

nej w miejscach ich styku [32]. Zewnętrzna błona ma właściwości sita molekularnego, a przez obecne w niej kanały VDAC (porównaj, *voltage-dependent anion channel*) do przestrzeni międzybłonowej przenikają cząsteczki o masie mniejszej niż 5 kDa. Wewnętrzna błona mitochondriów jest bardzo szczelna i selektywna w stosunku do przepuszczanych substancji [34].

W skład białek tworzących megakanał wchodzi również translokaza nukleotydów adeninowych (ANT) znajdująca się w błonie wewnętrznej mitochondrium. ANT1 występuje w sercu i mięśniach szkieletowych, gdy ANT2 w tkankach o potencjale regeneracyjnym (wątroba, nerki, śledziona, fibroblasty). Oprócz nukleotydów (ADP/ATP) kanał ANT transportuje anionową formę długocząsteczkowych kwasów tłuszczowych, a przez to może brać udział w rozprężaniu oksydatywnej fosforylacji. Polaryzacja błony, wysoki potencjał błony mitochondrialnej ($\Delta\Psi$), jony magnezu, nukleotydy adeninowe sprzyjają utrzymaniu megakanału w stanie zamkniętym. ROS, utleniając grupy sulfhydrylowe seryn białek tego kanału, promują powstanie mostków dwusiarczkowych, przez co zwiększają prawdopodobieństwo otwarcia tego megakanału [33, 35, 36]. Opisano, że przez megakanał stworzony przez kompleks ANT z VDAC z białkami towarzyszącymi uwalniany jest do cytozolu również anionorodnik ponadtlenkowy, generowany w mitochondriach [37]. Krótkotrwała ischemia nie powoduje otwarcia MPTP. Do ich otwarcia i wystąpienia obrzęku mitochondriów dochodzi dopiero w okresie reperfuzji, czyli w okresie nasilonej generacji ROS i zwiększenia wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺ i obniżenia pH [38] (Rycina 2.).

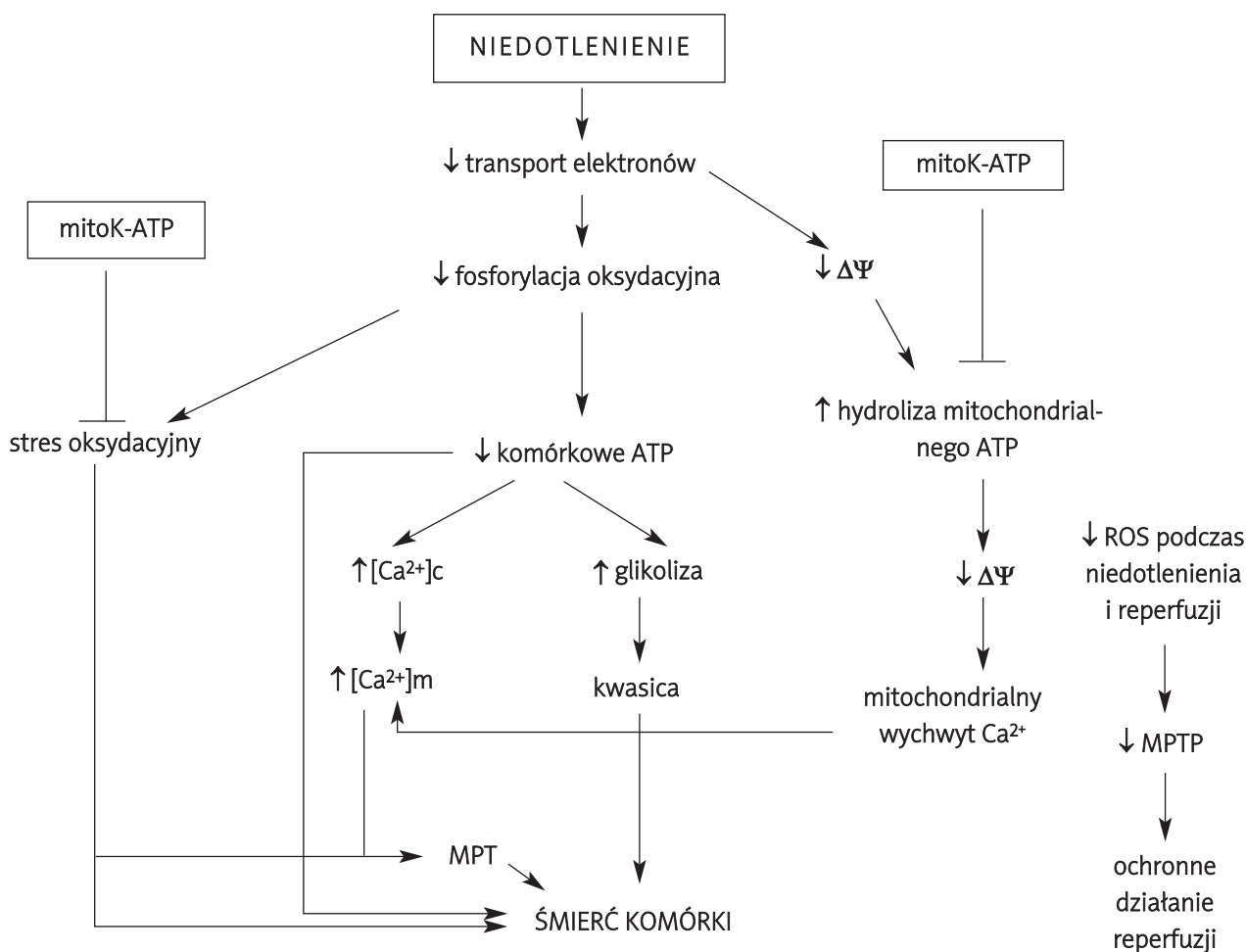
Ochrona funkcji MPTP (hamowanie przepuszczalności błony mitochondrialnej), czyli ochrona integralności błony mitochondriów mimo spadku ATP, może być istotnym zjawiskiem decydującym o losach komórki. W ten sposób, ochraniająco, działa cyklosporyna A [38]. Stwierdzono, że krótka aktywacja mitoK-ATP i krótki napływ jonów potasu do mitochondriów powoduje ich funkcjonalny, przejściowy obrzęk (nawet o 10% objętości) i aktywację oksydatywnej fosforylacji promującej syntezę ATP [25, 39].

Badania na hodowanych komórkach endotelialnych wykazały ekspresję Cx43 w błonach mitochondrialnych i mitochondriach [25, 40]. Cx43 jest więc również częścią wielobiałkowych kompleksów kształtujących kanały błon mitochondrialnych, np. mitochondrialnego kanału potasowego regulowanego przez ATP (mitoK-ATP), zależnych od jonów Ca²⁺. Przez to może powodować modyfikację funkcji tych kanałów wywołaną przez reaktywne formy tlenu (ROS) powstające w mitochondriach [31, 41, 42].

Badania grupy Li potwierdziły nadekspresję Cx43 z następczą nasiloną translokacją do mitochondriów w komórkach endotelialnych w warunkach stresu oksydacyjnego [25].

Podsumowanie

Jak wykazały dotychczasowe badania, Cx43 – białko występujące w błonach komórkowych, w warunkach stresu



Rycina 2. Kardioprotekcyjny efekt otwierania kanałów mitoK-ATP

$\Delta\Psi$ – potencjał błonowy, Ca^{2+} – stężenie jonów wapnia, MPT – mitochondrialne pory przejściowej przepuszczalności (ang. mitochondrial permeability transition), mitoK-ATP – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP

wych może ulegać translokacji i akumulacji w błonach mitochondrialnych, gdzie wraz z mitochondrialnymi kanałami $mitoK_{ATP}^{+}$ wydaje się odgrywać ważną rolę w cytoprotekcyjnym działaniu na komórki, uczestnicząc w zjawisku tzw. „hartowania tkanek” przez niedokrwienie/niedotlenienie (IP). Mitochondria biorą udział w fazie wyzwalającej IP, gdy niewielkie ilości ROS są generowane przez otwieranie kanałów $mitoK_{ATP}^{+}$ i dochodzi tylko do aktywującego generację ATP przejściowego obrzęku mitochondriów.

Otwieranie kanałów MPTP jest połączone z nasilonym napływem jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek. Hamowanie efektów otwierania MPTP przez aktywację Cx43 przemieszczającej się do błony mitochondrialnej może być więc istotnym mechanizmem dla przeżycia komórek i odgrywać ważną rolę w cytoprotekcyjnej funkcji zjawiska IP [43].

Piśmiennictwo

1. Jiang JX, Gu S. Gap junction- and hemichannel-independent actions of connexins. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1711: 208-14.
2. De Maio A, Vega VL, Contreras JE. Gap junction, homeostasis, and injury. *J Cell Physiol* 2002; 191: 269-82.
3. Dejana E, Corada M, Lampugnani MG. Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J* 1995; 9: 910-8.
4. Lampugnani MG, Dejana E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 674-82.
5. Sosinsky GE, Nicholson BJ. Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1711: 99-125.
6. Kańczuga-Koda L. Znaczenie połączeń typu gap w fizjologii i patofizjologii przewodu pokarmowego. *Postępy Hig Med Dosw* 2004; 58: 158-65.
7. Oyamada M, Oyamada Y, Takamatsu T. Regulation of connexin expression. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1719: 6-23.

8. Rutkowski R, Koszytła-Hojna B, Kańczuga-Koda L, et al. Struktura i fizjologiczna funkcja białek koneksynowych. *Postępy Hig Med Dosw* 2008; 62: 632-41.
9. Griffith TM. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? *Br J Pharmacol* 2004; 141: 881-903.
10. Kozłowska H, Baranowska M, Gromotowicz A, et al. EDHF – śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący. Znaczenie w fizjologii i chorobach naczyń krwionośnych. *Postępy Hig Med Dosw* 2007; 61: 555-64.
11. Alex J, Cale ARJ, Griffin SC, et al. Connexins: the basis of functional coupling of myocytes guvendik. *J Clin Basic Cardiol* 2005; 8: 19-22.
12. Pytkowski M, Kaczorowska M. Mutacje somatyczne w genie kodującym białko koneksynę 40 (GJA5) u chorych z migotaniem przedsionków. *N Engl J Med* 2006; 354: 2677-88.
13. Kliszek M, Małek ŁA, Koźluk E, et al. Genetyczne uwarunkowania najczęstszych arytmii. *Kardiologia Pol* 2006; 64: 601-5.
14. Płotek W. Budowa i funkcje synaps elektrycznych (gap junctions) w ośrodkowym układzie nerwowym. *Anestezjologia i Ratownictwo* 2008; 2: 274-82.
15. Oviedo-Orta E, Evans WH. Gap junction and connexin-mediated communication in the immune system. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1662: 102-12.
16. Sohl G, Willecke K. Gap junction and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 2004; 62: 228-32.
17. Koval M. Pathways and control of connexin oligomerization. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 159-66.
18. Bruzzone R, White TW, Paul DL. Connections with connexins: the molecular basis of direct intracellular signaling. *Eur J Biochem* 1996; 238: 1-27.
19. Harris AL, Darren L. Connexins, a guide. *Humana Press New York: Springer* 2008; 574.
20. Kanemitsu MY, Lau AF. Epidermal growth factor stimulates the disruption of gap junctional communication and connexin 43 phosphorylation independent of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-sensitive protein kinase C: the possible involvement of mitogen-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 837-48.
21. Shiokawa-Sawada M, Mano M, Hanada K, et al. Down-regulation of gap junctional intracellular communication between osteoblastic MC3T3-E1 cells by basic fibroblast growth factor and a phorbol ester (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate). *J Bone Miner Res* 1997; 12: 1165-73.
22. Shames DS, Minna JD, Gazdar AF. DNA methylation in health, disease, and cancer. *Curr Mol Med* 2007; 7: 85-102.
23. Hellebrekers DM, Griffioen AW, van Engeland M. Dual targeting of epigenetic therapy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 76-91.
24. Kiec-Wilk B, Polus A, Mikolajczyk M, Mathers JC. Beta-carotene and arachidonic acid induced DNA methylation and the regulation of pro-chemotactic activity of endothelial cells and its progenitors. *J Physiol Pharmacol* 2007; 58: 757-66.
25. Li H, Brodsky S, Kumari S, et al. Paradoxical overexpression and translocation of connexin 43 in homocysteine-treated endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: 2124-33.
26. Miura T, Ohnuma Y, Kuno A, et al. Protective role of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286: 214-21.
27. Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, et al. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2005; 67: 234-44.
28. Hatanaka K, Kawata H, Toyofuku T, et al. Down-regulation of connexin 43 in early myocardial ischemia and protective effect by ischemic preconditioning in rat hearts in vivo. *Jpn Heart J November* 2004; 45: 1007-19.
29. Liu LZ, Hu XW, Xia C, et al. Reactive oxygen species regulate epidermal growth factor-induced vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor-1alpha expression through activation of AKT and P70S6K1 in human ovarian cancer cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 41: 1521-33.
30. Lim KH, Javado SA, Das M, et al. The effect of ischemic preconditioning, diazoxide and 5-hydroxydecanoate on rat heart mitochondria volume and respiration. *J Physiol* 2002; 545: 961-74.
31. Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Lopez D, et al. The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Prog Biophys Mol Biol* 2007; 94: 219-32.
32. Schwanke U, Konietzka I, Duschin A, et al. No ischemic preconditioning in heterozygous connexin43-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283: 1740-2.
33. Więckowski MR. Mitochondrial megakanat w fizjologii i patologii komórki – nowe spojrzenie. *Postępy Biochem* 2008; 54: 71-81.
34. Rupniewska Z, Bojarska-Junak A. Apoptoza: Przepuszczalność błony mitochondrialnej i rola pełniona przez białka z rodziny Bcl-2. *Postępy Hig Med Dosw* 2004; 58: 538-47.
35. Suleiman MS, Halestrap AP, Griffiths EJ. Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 2001; 89: 29-46.
36. Hausenloy DJ, Cellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 339-41.
37. Han D, Antunes F, Canali R, et al. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from the mitochondria to cytosol. *J Biol Chem* 2003; 278: 5557-63.
38. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporine of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated heart death. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 1461-9.
39. Dembińska-Kieć A. Modyfikacja przepuszczalności błon mitochondrialnych w mechanizmie hartowania przez niedokrwienie. Rola receptorów opioidowych. *Kardiologia Pol* 2006; 64: 159-60.
40. Janczarska K, Kieć-Wilk B, Śliwa A, et al. Valuation of change of cx43 gene expression in HUVEC by fatty acid and beta carotene. 5th European Nutrigenomics Conference 2nd-5th September 2008 Potsdam Nutrient Sensing.
41. Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzejaet PP, et al. Mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 275: 1567-76.
42. Pain T, Yang XM, Critz SD, et al. Opening of mitochondrial K (ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res* 2000; 7: 460-6.
43. Boengler K, Stahlhofen S, van de Sand A, et al. Presence of connexin 43 in subsarcolemmal, but not in interfibrillar cardiomyocyte mitochondria. *Basic Res Cardiol* 2009; 104: 141-7.